昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

中红侧沟茧蜂雌蜂输卵管萼中病毒样纤丝的特征和功能

秦启联，龚 和，丁 翠，齐跃敏，甘雅玲，李世文
（中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080）

摘要：中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 雌蜂输卵管萼中有一种病毒样纤丝（virus-like filaments，VLFs）。在蜂卵从卵巢管通过输卵管萼产出的过程中，VLF 包裹在蜂卵的表面，随蜂卵进入寄主体内。透射电镜显示，VLF 中心是电子致密物质，外有单层膜包被，直径约 35 nm。负染技术表明，VLF 是具有左螺旋结构的纤丝，负染时的直径约 25 nm。不含 VLF 的蜂卵进入 3 龄初寄主后，全部被寄主血细胞包囊；含有 VLF 的蜂卵进入同样的寄主后，88.2%受到保护。VLF 对蜂卵的保护作用在不同发育期的寄主中不同，在 3 龄初的粘虫体内，平均有 64.7%的初产卵不被包囊，而在 4 龄初的粘虫体内，只有 9.5%的初产卵受到保护。这一结果说明，VLF 只能为蜂卵提供部分的保护作用，需配合其它寄生蜂因子（萼液、蜂毒等）共同作用于寄主的免疫系统。

关键词：中红侧沟茧蜂；粘虫；病毒样纤丝；包囊作用
中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2001）02-0170-06

内寄生蜂在产卵时，将许多活性物质随着寄生蜂卵一同注入寄主体内，为蜂卵和随后孵化的幼蜂营造了一个适合生长发育的内环境。这些物质包括来自雌蜂输卵管萼（calyx region）的多分 DNA 病毒（polydnavirus，PDV）、卵巢蛋白（ovarian protein，OP）、病毒样颗粒（virus-like particles，VLPs）、病毒样纤丝（virus-like filaments，VLFs）和毒腺内的毒液（venom）等。在保护寄生蜂免受寄主血细胞包囊反应（encapsulation）的攻击、抑制寄主免疫系统方面，这些物质起了非常重要的作用。多分 DNA 病毒免疫抑制的功能已经被大量的实例所证实[1~3]，然而 PDV 至少需要 2 h 才能侵入寄主血细胞，表达其基因产物，发挥免疫抑制的功能[2]。在蜂卵进入寄主体腔的早期，必须存在其它的机制提供保护作用。Webb 等认为齿唇姬蜂 *Campoletis sonorensis* 的卵巢蛋白和蜂毒通过破坏寄主浆细胞和粒细胞的细胞骨架，抑制寄生早期血细胞对蜂卵的包囊反应[4,5]。而侧沟茧蜂 *Microplitis croceipes*、绒茧蜂 *Apanteles congregatus*[6]、*A*. *hyphantriae*[7]和姬蜂 *Venturia canescens*[8]的输卵管萼液中的病毒样颗粒（VLP），能抑制各自寄主对初产卵的包囊反应，其中，*V*. *canescens* 的 VLP 包裹在蜂卵的表面，使蜂卵躲避了寄主免疫系统的识别[8,9]。另外，Tanaka 报道了中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 输卵管萼液中含有一种具有 DNA 分子的病毒样纤丝（VLF）。这种 VLF 粘附在蜂卵的表面，对保护蜂卵起了一定的作用[10]。本文作者就中红侧沟茧蜂 VLF 的特征

基金项目：国家自然科学基金资助项目(39870099,30000017)和农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室资助项目(9912)
收稿日期：1998-12-16；接受日期：1999-09-28

和功能进行了研究。

1　材料和方法

1.1　实验昆虫

中红侧沟茧蜂以 3 龄粘虫 *Mythimna separata* 作为寄主饲养，成蜂收集在放有 10% 蜜糖水棉球的指型管中。粘虫用半人工饲料[11]，在（25±0.5)℃，16 L∶8 D 光周期的条件下喂养。

1.2　雌蜂卵巢内卵的获得

雌蜂生殖系统的构造见图版Ⅰ-1。乙醚麻醉雌蜂，在Ringer's 生理盐水中，用尖嘴镊夹着腹部末端，轻轻拉出生殖系统。以卵巢管末端的缢缩为界，获得两种类型发育成熟（以卵顶部的滋养细胞消失作为标志）但未产出的卵，即卵巢管卵和输卵管萼区卵。得到的蜂卵用 Ringer's 生理盐水清洗 5 次，注射寄主或显微观察。

1.3　初产卵的获得

在装有 20 头左右交配过雌蜂的指型管中，放入 3 龄的粘虫持续 0.5 h，使雌蜂在寄主体内产出多粒卵，解剖寄主，得到初产的蜂卵。用Ringer's 生理盐水清洗 5 次，注射寄主或显微观察。

1.4　注射寄主

选取 3 龄初（2 龄蜕皮后 0 天）和 4 龄初（3 龄蜕皮后 0 天）的粘虫注射蜂卵，以测定 VLF 对不同蜂卵（卵巢管卵、输卵管萼区卵、初产卵）的保护作用。将寄主浸没于蒸馏水中 10 min 后取出，用拉细的玻璃针吸取 1 粒上述清洗过的蜂卵，随同 0.5 μL 的Ringer's 生理盐水从粘虫腹部第 1 对腹足之一注入。注射后的粘虫用半人工饲料，在（25±0.5)℃，16 L∶8 D的光周期下饲养，24 h 后剖检蜂卵被包囊的情况。

1.5　电镜观察

1.5.1　透射电镜：将 2 龄粘虫暴露在 30 头雌蜂的攻击下 5 min 后，立即投入 4℃，2.5% 的戊二醛中前固定 4 h 以上，0.1 mol/L 的 PBS 冲洗，1% 的锇酸后固定 2 h，乙醇梯度脱水，Epon 812 包埋，选取腹部第 3 对腹足附近（观察表明，蜂卵多集中于此部）进行超薄切片，醋酸铀和柠檬酸铅染色，透射电镜观察。

在Ringer's 生理盐水中拉出雌蜂卵巢，尖嘴镊撕破输卵管萼，吸取少量萼液（calyx fluid）滴在覆有 Formvar 膜的铜网上，再滴加少量 2% 磷钨酸溶液，自然风干后透射电镜观察。

1.5.2　扫描电镜：用 0.1% 的聚赖氨酸预处理盖玻片作为载体，三种蜂卵（卵巢管卵、输卵管萼区卵、初产卵）分别沉积在这种盖玻片上，4% 的戊二醛 4℃ 下固定 1 天以上，0.1 mol/L 的 PBS 冲洗，乙醇梯度脱水，醋酸异戊酯浸透，临界点干燥，喷金后扫描电镜观察。

2　结果

2.1　VLF 的形态、分布和去向

从卵巢管、输卵管萼和寄主体内分别得到三种类型的蜂卵，扫描电镜结果显示，来自卵

巢管的蜂卵表面光滑，没有外物附着（图版Ⅰ：2）；而来自输卵管萼的蜂卵和寄主体内的初产卵表面都附有大量的絮状纤丝（图版Ⅰ：3，4），说明卵巢管中不含有 VLF，而蜂卵在从卵巢管经过输卵管萼后，表面获得了 VLF，即 VLF 存在于输卵管萼中。对于单个的雌蜂来说，每次产卵的间隔在 1 min 以上，这段时间可能保证了蜂卵从卵巢管进入输卵管萼能够充分地“孵育”，使之带上 VLF。从透射电镜可以看出，产出卵的表面有直径约 35 nm 的颗粒（VLF 被横切时）或纤丝（被纵切时）附着（图版Ⅱ：5）。同时可以看出，VLF 内含电子致密物质，外有膜包被。本实验透射电镜观察到 VLF 膜内包含的电子致密物质可能是 DNA。另外，从负染电镜同样可以观察到萼液的 VLF 的存在（图版Ⅱ：6），此时见到的 VLF 是一种具有左螺旋结构的极长的细丝，直径约 25 nm。

2.2 VLF 对蜂卵的保护作用

由上述显微观察的结果得知，卵巢管中的卵表面没有 VLF，而输卵管萼中的蜂卵表面附有大量的 VLF。将这两种类型的蜂卵分别注射入 3 龄初的粘虫体内，可以见到 88.24% 的具有 VLF 的蜂卵（输卵管萼区卵）受到保护，而没有 VLF 的蜂卵（卵巢管卵）全部受到寄主免疫系统的攻击（表 1）。这一结果说明，VLF 能够使蜂卵免遭寄主免疫系统的攻击，保护蜂卵不被寄主血细胞包囊。

为了进一步实验 VLF 对蜂卵的保护作用，将初产卵经Ringer’s 生理盐水清洗 5 次后，注入两种不同发育龄期的寄主，24 h 后检查蜂卵被包囊的情况，结果见表 2。

表 1 3 龄初粘虫对不同部位蜂卵的免疫反应

Table 1 Immune response to the parasitoid eggs from different ovary regions injected into 3rd instar host larva

蜂卵的来源 Source of parasitoid egg	注射虫数（头） Number of hosts injected	未被包囊卵数（粒） Number of unencapsulated eggs	被包囊卵数（粒） Number of encapsulated eggs	未被包囊卵的百分率（%） Percentage of unencapsulated eggs
卵巢管 lateral oviduct	20	0	14	0
输卵管萼区 calyx region	20	15	2	88.2

表 2 注射 24 h 后初产卵在不同寄主体内的状况

Table 2 State of the newly-laid parasitoid eggs in different age hosts 24 hour after injection

寄主龄期 Host age	注射虫数（头） Number of hosts injected	重复次数 Repeated times	未被包囊卵（%）* Average percentage of unencapsualed eggs
3 龄初 early 3rd instar	20	3	64.72 ± 3.84
4 龄初 early 4th instar	20	3	9.51 ± 12.4

* 平均值 ± 标准差 Mean ± *SD*

高龄幼虫包囊异物的能力大于低龄幼虫[14]。3 龄初的粘虫体内平均有 64.72% 的初产卵受保护不被寄主血细胞攻击；而对于 4 龄初粘虫，平均只有 9.51% 的初产卵不被包囊。由此可以看出，当寄主免疫能力提高时，受 VLF 保护的蜂卵被寄主血细胞包囊的数目迅速增加，也就是 VLF 为蜂卵提供了一种有限的保护作用，不足以抵抗寄主较强的免疫攻击。实际上，自然状态下雌蜂产卵或蜂卵随同萼液一同注入 4 龄初寄主，蜂卵不被包囊的比率几乎达

100%（未显示资料）。这种情况下，萼液起了极其重要的作用。虽然目前没有中红侧沟茧蜂PDV 的报道，但有迹象表明，该寄生蜂萼液中除了 VLF 外，还有 PDV 的存在（另文报道）。

另外，在蜂卵注入寄主后 24 h，所有被包囊的卵都没有或少有开始进行胚胎发育，并且有部分卵表面黑化；在未被包囊的蜂卵中，初产卵（受精或未受精的）都能进行正常的胚胎发育（图版Ⅱ：7），而没有产出的输卵管萼区中的卵，看不到任何胚胎发育的迹象，形态上仍象 24 h 前在输卵管萼中一样。

3　讨论

昆虫血细胞对异物的识别机制还不完全清楚[16,17]，但有些寄生蜂卵或幼虫的表面物质同寄主某些蛋白具有相同的免疫原性，使寄主的免疫识别系统将之作为自身物质而认同[16]，这种模拟寄主物质，被动躲避寄主免疫系统监控的机制，往往和其它主动破坏或抑制寄主免疫系统的机制协同作用，保护寄生蜂能够在寄主血腔中安全正常地生长发育。中红侧沟茧蜂的 VLF 包裹在蜂卵的表面，针对不同龄期的寄主，为蜂卵提供了不同程度的保护作用，虽然这种保护作用更象是以上所述的被动躲避机制，但目前对此还没有直接的证据；不过，其它的实验表明，所有注射具有 VLF 蜂卵的寄主，蜂卵一旦被免疫系统杀死，那么该寄主都能正常生长发育，最终化蛹、羽化（未显示资料）；这一结果不同于 PDV 对寄主的作用，PDV 不仅能够主动抑制寄主的免疫反应，而且能够抑制寄主的发育，使之不能化蛹[18]。由此，VLF 的作用似乎只限于为初产的蜂卵提供部分的保护作用。

VLF 负染电镜中左螺旋的形态是一种有趣的结构，这种结构是否在 VLF 粘附蜂卵和/或躲避寄主免疫识别，进而保护蜂卵的功能中起了作用，现在还不清楚，对这一问题的进一步研究，将为回答昆虫免疫识别机制的问题提供线索。

致谢　感谢动物研究所于延芬女士和买国庆先生在照片冲洗过程中提供的帮助。

参　考　文　献（References）

[1] Edson K M, Vinson S B, Stoltz D B *et al*. Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoids host. Science, 1981, 211: 582～583

[2] Stoltz D B, Vinson S B. Viruses and parasitism in insects. Adv. Virus. Res., 1979, 24: 125～171

[3] Lavine M D, Beckage N E. Polydnaviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction. Parasitol. Today, 1995, 11: 368～378

[4] Webb B A, Luckhart S. Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1994, 26: 147～163

[5] Webb B A, Luckhart S. Factors mediating short- and long-term immune suppression in a parasitized insect. J. Insect Physiol., 1996, 42: 33～40

[6] Stoltz D B, Vinson S B, MacKinnon E A. Baculovirus-like particles in the reproductive tracts of female parasitoid wasps. Can. J. Microbiol., 1976, 22: 1 013～1 023

[7] Stoltz D B, Vinson S B. Penetration into caterpillar cells of virus-like particles injected during oviposition by parasitoid ichneumonid wasps. Can. J. Microbiol., 1979, 25: 207～216

[8] Rotheram S. Encapsulation of the egg of a parasitic insect. Ⅱ. The ultrastructure of the particulate coat on the egg of Nemeritis. Proc. Roy. Soc. London, 1973. 183: 195～204

[9] Feddersen L, Sander K, Schmidt O. Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. Experientia, 1986, 42: 1 278～1 281

[10] Tanaka T. Morphology and functions of calyx fluid filaments in the reproductive tracts of endoparasitoid, *Microplitis mediator* (Hym.: Braconidae). Entomophaga, 1987: 9～17

[11] 李秀珍，龚佩瑜，吴坤君. 粘虫在不同温度下的生命表及其发育的热量需要. 昆虫学报，1992，35：415～421

[12] Eslin P, Prevost G. Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. J. Insect Physiol., 1998, 44: 807～816

[13] Webley D P. Blood cell counts in the African migratory locust (*Locusta migratoria migratorioides* Rechihe and Fairmaire). Proc. Roy. Ent. Soc. Lond., 1951, A26: 25～37

[14] Brodeur J, Vet E M L. Relationship between parasitoid host range and host defense: a comparative study of egg encapsulation in two related parasitoid species. Physiol. Entomol., 1995, 20: 7～12

[15] Went D F, Krause G. Normal development of mechanically activated, unlaid eggs of an endoparasitic hymenopteran. Nature, 1973, 244: 454～455

[16] Strand M R, Pech L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. Ann. Rev. Entomol., 1995, 40: 31～56

[17] Gillespie J P, Kanost M R, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. Ann. Rev. Entomol., 1997, 42: 611～643

[18] Soller M, Lanzrein B. Polydnavirus and venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* (Braconidae) induce developmental arrest in the prepupa of its host *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). J. Insect Physiol., 1996, 42: 471～481

Property and function of virus-like filaments in calyx region of the endoparasitoid *Microplitis mediator*

QIN Qi-lian, GONG He, DING Cui, QI Yue-min, GAN Ya-ling, LI Shi-wen

(State Key Laboratory of Integrated Management of Insects and Rodents, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: There were virus-like filaments (VLFs) in the calyx regions of oviduct in the female wasp, *Microplitis mediator* Haliday. When an egg passed through the calyx region, the VLF attached to its surface and entered into the hemocoel of the host along with the egg. Transmission electron microscopy showed that an electron dense core of 35 nm in diameter was wrapped by one-layer membrane in the center of the VLF. The VLF exhibited a very long levogyrate structure with a diameter of 25 nm under negative staining. All of the wasp's eggs without VLFs were encapsulated in the hosts, early 3rd instar larvae of *Mythimna separata* while 88.2% of eggs were protected from encapsulation when they were covered by VLFs in the same host. The ability of VLF in protecting the wasp's eggs from encapsulation was different in the hosts at different stages. 64.7% and 9.5% newly-laid eggs was unencapsulated in the early 3rd and 4th instar host larvae respectively. These results suggested that the VLF only provided partial protection for the

wasp's eggs and other factors (calyx fluid and venom, etc.) should make certain contribution to the immune system of the host, too.

Key words: *Microplitis mediator*; *Mythimna separata*; virus-like filaments; VLF; encapsulation

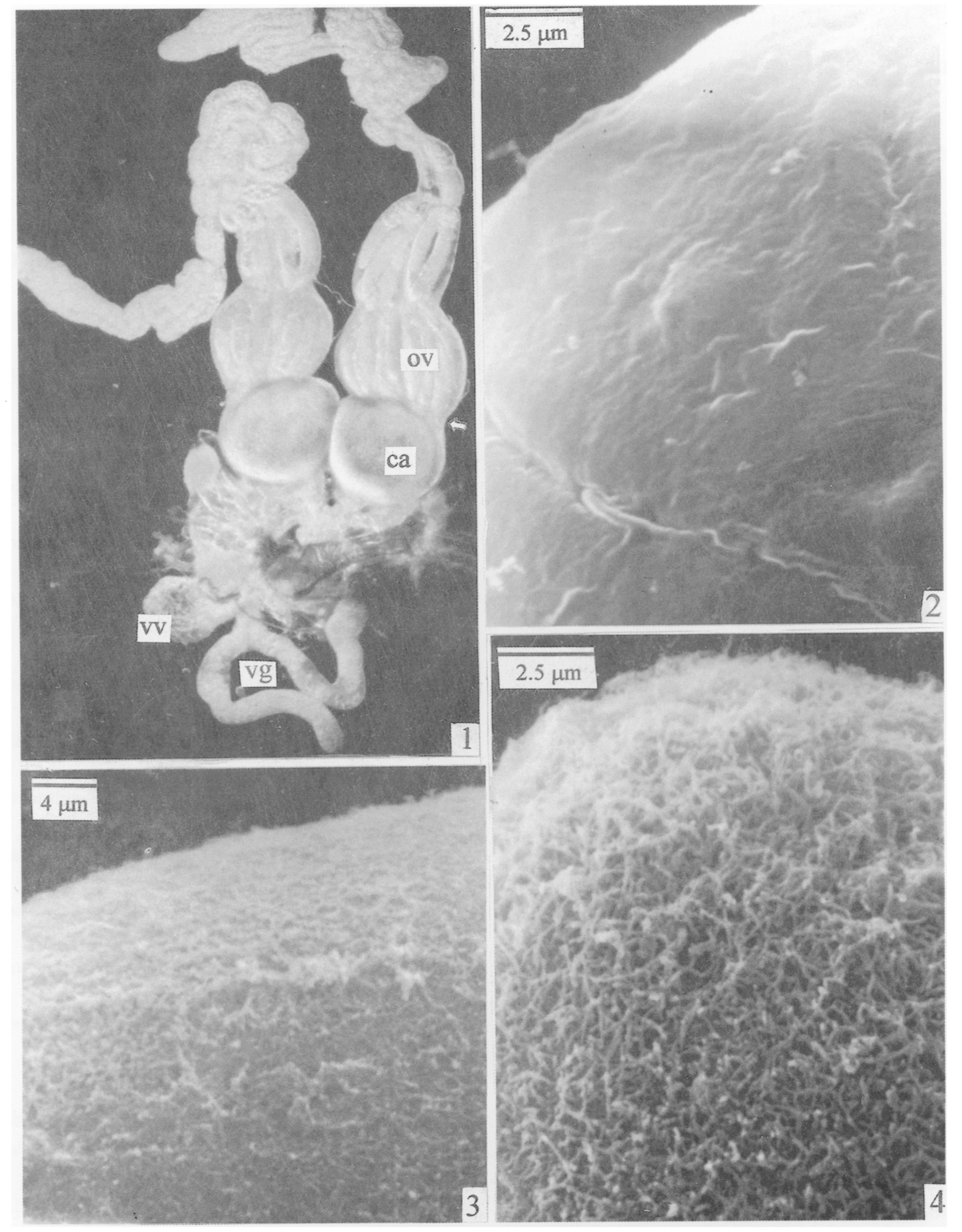
图 版 说 明 (Explanation of Plates)

图版 Ⅰ (Plate Ⅰ)

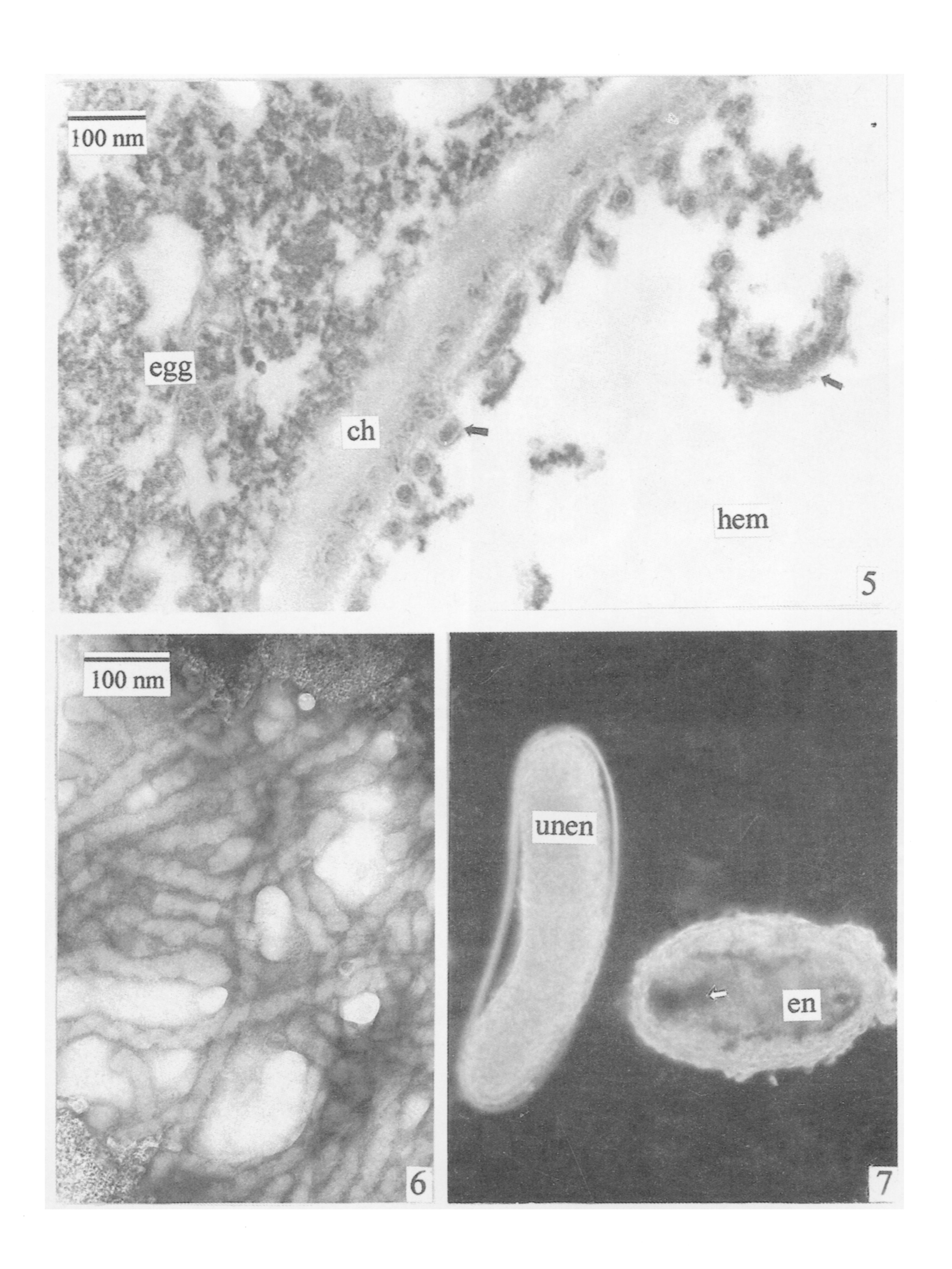
1. 雌蜂的生殖系统 reproductive system of the female wasp
   ca：输卵管萼 calyx；ov：卵巢管 ovariole；vg：毒腺 venom gland；vv：毒囊 venom vesicle
   箭头示卵巢管和输卵管萼之间的缢缩，实验用的两种未产出的蜂卵分别来自卵巢管（ov）和输卵管萼（ca）
   The arrow shows shrink between ovariole and calyx. The eggs for injection came from ovariole and calyx, respectively
2. 卵巢管中蜂卵的扫描电镜 SEM of the egg from ovariole
3. 输卵管萼中蜂卵的扫描电镜（表面有大量的 VLF）SEM of the egg from calyx, on which there are a lot of VLFs
4. 初产卵的扫描电镜（表面有大量的 VLF）SEM of newly-laid egg, on which there are a lot of VLFs

图版 Ⅱ (Plate Ⅱ)

5. 初产卵在寄主体内的透射电镜 TEM of newly-laid egg in hemocoel of the host
   egg：寄生蜂卵 parasitoid egg；ch：卵壳 chorion；hem：寄主体腔 hemocoel of the host
   箭头示卵壳表面的 VLF，可见到电子致密的核心外包有单层的膜
   The arrow shows VLFs on the chorion, in which an electronic dense core covered by a single membrane can be seen
6. 雌蜂输卵管萼液的负染电镜（VLF 呈左螺旋的结构）
   Electronic micrograph of calyx fluid, in which VLFs show levogyrate structure, negative stained
7. 初产卵分别注射入 3 龄初和 4 龄初的粘虫 12 h 后，蜂卵的状况
   State of newly-laid parasitoid eggs 12 hour after injection into early 3rd and 4th host hemocoel, respectively
   unen：3 龄初粘虫体内的蜂卵未被包囊，并且进行正常的胚胎发育 Embryogenesis of an unencapsulated parasitoid egg in early 3rd instar host hemocoel；en：4 龄初粘虫体内的蜂卵被多层血细胞包囊，并且有部分黑化（箭头指示处）A parasitoid egg encapsulated by multilayer hemocytes in early 4th instar host hemocoel, the arrow indicated the melanized part on the egg



图版说明见文后（Explanation at the end of the text）



图版说明见文后（Explanation at the end of the text）